



TITLE:

Phospholipid Flippase Activity and Cellular Function of Class 5 P4-ATPases(Abstract_要旨)

AUTHOR(S):

Naito, Tomoki

CITATION:

Naito, Tomoki. Phospholipid Flippase Activity and Cellular Function of Class 5 P4-ATPases. 京都大学, 2017, 博士(薬科学)

ISSUE DATE:

2017-03-23

URL:

<https://doi.org/10.14989/doctor.k20305>

RIGHT:

This research was originally published in The Journal of Biological Chemistry. Tomoki Naito, Hiroyuki Takatsu, Rie Miyano, Naoto Takada, Kazuhisa Nakayama, and Hye-Won Shin Phospholipid flippase ATP10A translocates phosphatidylcholine and is involved in plasma membrane dynamics. J. Biol. Chem. 2015; 290: 15004-15017 cthe American Society for Biochemistry and Molecular Biology.

京都大学	博 士（薬科学）	氏 名	内藤 朋樹
論文題目	Phospholipid Flippase Activity and Cellular Function of Class 5 P4-ATPases (クラス5 P4-ATPaseのリン脂質フリッパーゼ活性と細胞内での機能)		
<p>(論文内容の要旨)</p> <p>生体膜は脂質二重層からなり、そのリン脂質組成は外葉と内葉の間で非対称に保たれている。例えば、細胞膜では、ホスファチジルコリン（PC）やスフィンゴミエリン（SM）が細胞外側（外葉）に多く存在するのに対して、細胞質側（内葉）にはホスファチジルセリン（PS）やホスファチジルエタノールアミン（PE）が豊富に存在している。この非対称性は、リン脂質を外葉から内葉へと転移させるフリップによって時間的・空間的に調節されている。真核細胞では、P4-ATPaseがリン脂質のフリップを行うフリッパーゼとして機能している。</p> <p>P4-ATPaseは、P型ATPaseスーパーファミリーに属する一群のサブファミリーである。他のP型ATPaseはイオンを輸送するのに対して、P4-ATPaseはイオンよりもはるかに大きなリン脂質を輸送することが、酵母を用いた研究によってわかっている。哺乳類には14種類のP4-ATPaseが存在しており、アミノ酸配列の類似性からいくつかのクラスに分類されている。これまでに、クラス6に分類されるATP11AやATP11Cは、アミノリン脂質（PSやPE）をフリップすることがわかっている。一方、クラス5のP4-ATPase（ATP10A、ATP10B、ATP10D）に関する研究はほとんど行われておらず、これらの細胞内局在やフリップするリン脂質の特異性は不明であった。ATP10AやATP10Dの欠損は糖尿病や肥満などの病態との関連性が示唆されており、これらのP4-ATPaseの機能の解明は重要な課題である。そこで著者は、クラス5 P4-ATPaseの酵素学的性質および細胞内での機能を明らかにするために以下の研究を行った。</p> <p>第一章：クラス5 P4-ATPaseの細胞内局在とCDC50タンパク質とのパートナーシップ</p> <p>P4-ATPaseは膜10回貫通型タンパク質であり、小胞体で生合成された後、ゴルジ体以降に輸送されるためにCDC50というシャペロン様タンパク質を必要とする。哺乳類ではCDC50AとCDC50Bがユビキタスに発現している。クラス5 P4-ATPaseの細胞内局在を調べたところ、ATP10A、ATP10B、ATP10DのいずれもCDC50Aとの共発現時のみに小胞体から輸送され、</p>			

ATP10AとATP10Dは細胞膜に、ATP10Bは後期エンドソームに局在するようになった。共免疫沈降実験によって、クラス5 P4-ATPaseとCDC50Aが相互作用していることが確認された。さらに、内在性のCDC50Aの発現をRNAi法により抑制することによって、ATP10AやATP10Dは細胞膜に局在できなくなった。これらの実験結果から、すべてのクラス5 P4-ATPaseがCDC50Aをパートナーとすること、およびCDC50Aと結合することによって小胞体からの輸送が正常に行われることが明らかになった。さらに、クラス5 P4-ATPaseどうしの中で作製したキメラタンパク質を用いた実験によって、クラス5 P4-ATPaseの細胞内局在には、そのN末端細胞質領域が重要であることが示唆された。

第二章：ATP10Aの基質特異性と細胞膜ダイナミクスへの関与

ATP10AのPCフリップ活性の同定

著者の所属する研究室では、蛍光標識リン脂質を用いた細胞膜におけるリン脂質フリップ活性の測定法を確立している。細胞膜に局在するATP10AとATP10Dについて基質特異的なフリップ活性を測定したところ、ATP10Aを発現させた細胞においてPCフリップ活性の顕著な上昇が見られた。このPCフリップ活性の上昇は、ATP10AのATPase活性欠損変異体を発現させた細胞では見られなかった。ATP10Aは他のリン脂質に対してはフリップ活性を示さなかったことから、PC特異的なフリッパーゼであることが明確になった。一方、ATP10Dは調べたかぎりいずれのリン脂質に対してもフリップ活性を示さなかった。

PCフリップ活性の亢進による細胞膜ダイナミクスの変化

ATP10Aを発現すると、細胞の形態が変化して細胞のサイズが減少した。さらに、ATP10A発現細胞では細胞接着の遅延とスプレディングの抑制が見られた。そこで、細胞接着因子であるインテグリンの動態について調べたところ、ATP10Aを発現させた細胞ではインテグリンのエンドサイトーシスが亢進していた。このような変化は、ATPase活性欠損変異体を発現させた細胞では見られなかった。以上の結果から、ATP10Aの発現によるPCフリップの亢進が細胞膜の脂質二重層間のリン脂質組成を変化させ、細胞の形態変化やインテグリンの動態変化を引き起こし、それによって細胞接着やスプレディングを遅延させたと考えられる。

(論文審査の結果の要旨)

P 型 ATPase スーパーファミリーに属する P4-ATPase サブファミリーは、生体膜の脂質二重層において脂質を細胞外（内腔）側からサイトゾル側へと移動するフリッパーゼである。生体膜の脂質二重層の間には脂質組成の非対称が存在し、P4-ATPase はこの脂質二重層間の時空間的非対称性を調節していると考えられている。近年、長年不明であったアミノリン脂質のフリッパーゼとして P4-ATPase (ATP11A, ATP11C) が同定され、主に細胞膜のサイトゾル側に存在するアミノリン脂質の分布を調節することが明らかになった。また、P4-ATPase の遺伝子変異による遺伝病の存在および変異マウスの解析により、P4-ATPase は細胞の恒常性や組織の恒常性に必須であることが示された。しかしながら、14 種類あるヒトの P4-ATPase の基質特異性やその生理的機能に関してはほとんどわかっていない。そこで、著者は P4-ATPase のうち、最も研究が進んでいないクラス 5 に分類される ATP10 ファミリーに注目し、その酵素学的性質と細胞機能の解明を目指した。第一章では、多くの P4-ATPase のシャペロン様の機能を果たす CDC50 タンパク質と ATP10 ファミリーの関連を詳細に検討し、ATP10 ファミリーの細胞内局在を調べた。さらに、ATP10 タンパク質同士のキメラタンパク質を用いて細胞内局在において重要な領域の同定を検討した。第二章では、細胞膜に局在する ATP10 タンパク質のフリッパーゼ活性および基質特異性を調べた。さらに、ATP10A のフリップ活性亢進による細胞の形態変化を見出し、細胞の接着や伸展 (spreading) および接着因子のエンドサイトーシスについて検討した。

著者は第一章で、ATP10 ファミリーが CDC50A タンパク質と結合することを共免疫沈降法によって明らかにした。さらに、ATP10 ファミリーの細胞内局在が CDC50A タンパク質依存的であることを ATP10 と CDC50 タンパク質の共発現および CDC50A のノックダウン実験により明らかにした。そのなかで、ATP10A および ATP10D は細胞膜に局在し、ATP10B は後期エンドソームおよびリソソームに局在することを明らかにし、これらのタンパク質が細胞内の異なる場所で機能することを示唆した。また、ATP10 タンパク質同士のキメラタンパク質を作製し、その細胞内局在を調べた結果、ATP10B の N 末端細胞質領域が後期エンドソームやリソソームへの局在を決定することを見出した。さらに、ATP10D の N 末端細胞質領域は細胞膜局在に必要であることを示した。したがって、ATP10 ファミリータンパク質は小胞体で生合成された後、CDC50A タンパク質と相互作用することにより、その機能すべき場所へと輸送されることが明らかになった。また、特定の場所への局在には N 末端細胞質領域が重要であることを示したことから、この領域に結合するエフェクターの存在が示唆された。本研究は、これまでに不明であった ATP10 ファミリーの細胞内局在、局在化シグナル領

域の存在および CDC50A 依存性を初めて明らかにしたことで、ATP10 ファミリーの機能解析の研究基盤を提供している。

第二章では、細胞膜に局在する ATP10A および ATP10D の基質特異性を検討した結果、ATP10A がアミノリン脂質ではなく、ホスファチジルコリン (PC) を特異的にフリップすることを初めて明らかにした。この ATP10A の PC に対するフリップ活性は他の P4-ATPase の PC フリップ活性より高いことや ATP10A の過剰発現細胞では、細胞の形態が変化することを見出した。PC は細胞膜脂質二重層の外側に多く存在するリン脂質であることから、ATP10A 発現による PC-フリップの亢進がサイトゾル側への PC の量を増加させることで、細胞の形態が変化したと考えられた。このような細胞の形態変化のみならず、細胞の接着および細胞の伸展 (spreading) が遅延することを見出した。したがって、ATP10A の発現によって細胞膜脂質二重層間の PC バランスが変化し、細胞接着、spreading が遅延したことが考えられた。また、ATP10A 発現による PC フリップ活性の亢進は、細胞接着に関わるインテグリンのエンドサイトーシスを亢進することがわかった。本研究により、リン脂質フリップ活性による細胞膜ダイナミクスの変化が初めて示唆された。したがって、本研究は、細胞膜ダイナミクスの調節を必要とする細胞運動やエンドサイトーシスなどの細胞機能において脂質組成変化という新たな観点からの研究基盤を提供する。

よって本論文は博士(薬科学)の学位論文として価値あるものと認める。また、平成 29 年 2 月 20 日論文内容とそれに関連した事項について試問を行った結果、合格と認めた。